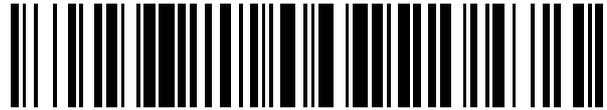


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 680 920**

51 Int. Cl.:

**C07H 1/08** (2006.01)

**C13K 5/00** (2006.01)

**C08B 37/00** (2006.01)

**A61K 31/715** (2006.01)

**A23C 7/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.07.2011 PCT/US2011/043644**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.01.2012 WO12009315**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.07.2011 E 11807372 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.05.2018 EP 2593466**

54 Título: **Oligosacáridos de leche bovina**

30 Prioridad:

**12.07.2010 US 363432 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**11.09.2018**

73 Titular/es:

**THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA (100.0%)  
1111 Franklin Street, 12th Floor  
Oakland, CA 94607, US**

72 Inventor/es:

**GERMAN, J. BRUCE;  
MILLS, DAVID;  
LEBRILLA, CARLITO B.;  
BARILE, DANIELA y  
LOCASCIO, RICCARDO**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

ES 2 680 920 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Oligosacáridos de leche bovina

5 **Referencia cruzada a solicitudes de patente relacionadas**

La presente solicitud de patente reivindica el beneficio de prioridad a la solicitud de patente provisional de EE.UU. N.º 61/363.432, presentada el 12 de julio de 2011.

10 **Antecedentes de la invención**

Hidratos de carbono en la superficie celular intestinal humana son sitios de reconocimiento importantes para la unión de bacterias patógenas que inician la infección. También son los principales componentes de los oligosacáridos de la leche humana (HMO). Dependiendo del ciclo de lactación, la leche humana contiene > 4 g/l de esta mezcla compleja y heterogénea de oligosacáridos [1]. HMO están compuestos por la disposición en serie de D-glucosa, D-galactosa, N-acetilglucosamina, L-fucosa y ácido N-acetilneuramínico (Neu5Ac). A pesar de este gran potencial combinatorio, la leche humana contiene precisamente más de 200 oligosacáridos [1]. Los HMO contienen un resto de lactosa (Gal $\beta$ 1-4Glc) en su extremo reductor con unidades de lacto-N-biosa I (LNB; Gal $\beta$ 1-3GlcNAc) o lactosamina (Gal $\beta$ 1-4GlcNAc) alargados de un enlace  $\beta$ 1-3 o  $\beta$ 1-6 al extremo de lactosilo. Una característica peculiar de HMO es su fucosilación terminal mediante enlaces  $\alpha$ 1-2/3/4 y/o por sialilación  $\alpha$ 2-3/6. En ausencia de actividades de fucosidasa y sialidasa, estos restos obstruyen las estructuras de núcleo de HMO de la fermentación microbiana. Los HMO no son digeridos por las enzimas gastrointestinales de los lactantes y permanecen en gran medida intactos hasta que llegan al intestino grueso, donde pueden ser usados como sustrato fermentable por las bacterias residentes. Una de sus funciones es actuar de sustrato selectivo para estimular el crecimiento colónico y la proliferación de bacterias específicas, tales como bifidobacterias [2].

Los HMO son una clase de oligosacáridos indigeribles que funcionan de prebióticos, o "componentes selectivamente fermentados que permiten cambios específicos, tanto en la composición y/o actividad en la microbiota gastrointestinal que confiere beneficios al bienestar y salud del hospedador" [3]. El intestino grueso de bebés lactantes está continuamente expuesto a copiosas cantidades de HMO de la leche materna y se caracteriza por una microbiota dominada por especies bifidobacterianas. La función de HMO es nutrir selectivamente el crecimiento de cepas específicas de bifidobacterias que sensibilizan el desarrollo de una microbiota intestinal única en bebés alimentados con leche materna [4, 5, 6].

Estudios recientes que investigan el catabolismo y la fermentación de HMO por cepas individuales de bifidobacterias transmitidas por los bebés han mostrado que *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* puede crecer ampliamente en HMO como única fuente de carbono, mientras que las especies bifidobacterianas transmitidas por los adultos presentaron un perfil de crecimiento más restringido [26]. No todas las bifidobacterias pueden crecer en HMO, por ejemplo, dentro de las subespecies de *B. longum* relacionadas, solo cepas que pertenecen a la subsp. *infantis* son capaces de crecer en HMO. Se ha mostrado la capacidad limitada de HMO para *B. bifidum*, mientras que *B. B. adolescentis* y *B. animalis* subsp. *lactis* son incapaces de metabolizar estos oligosacáridos complejos. Estos resultados sugieren que los HMO pueden promover selectivamente el crecimiento de ciertas cepas bifidobacterianas en la luz colónica frecuentemente aislada de bebés lactantes [23, 24].

Se ha mostrado recientemente que en comparación con sus hermanos no autistas, el microbioma fecal de niños con trastornos del espectro autista (TEA) contiene una elevada diversidad de *Clostridia* spp. y cifras más altas de células del grupo de *Clostridium histolyticum* [9]. La ausencia de un prebiótico altamente específico, sustratos, tales como HMO, ha impedido que el desarrollo de terapias para bebés y niños desplaze las poblaciones de *Clostridia* spp. con poblaciones de *Bifidobacteria* spp. no patógenas beneficiosas.

Las infecciones entéricas son responsables de ~2,1 millones de muertes al año y son la principal causa de mortalidad de niños y bebés en países en desarrollo [10]. Frecuentes manifestaciones de diarrea son comunes entre poblaciones de bebés por cesárea, prematuros y alimentados con leche artificial, y su coste en el sistema sanitario es entre 400 \$ y 1600 \$ por bebé tratado [11, 12]. Exclusivamente los bebés lactantes que poseen una microbiota colónica de bebé rica en bifidobacterias tienen tasas espectacularmente más bajas de infecciones entéricas, enterocolitis necrotizante (NEC) y gastroenteritis [11, 13, 14]. Existe una fuerte evidencia del uso de prebióticos y bifidobacterias para prevenir NEC en bebés prematuros [15].

Los oligosacáridos fucosilados son abundantes en la leche humana [16] y se sabe que inhiben la unión de bacterias patógenas. HMO, y en particular los HMO fucosilados, comparten motivos estructurales comunes con glicanos en los epitelios intestinales del bebé conocidos por ser receptores para patógenos. Tales estructuras implican que su presencia en la leche proporciona a su hospedador una estrategia defensiva, con un HMO 1,2-fucosilado que actúa de barrera para prevenir la unión de patógenos tales como *Campylobacter jejuni* y calicivirus a células epiteliales, protegiendo así a los bebés de la enfermedad [4, 17]. Los HMO, y en particular los HMO fucosilados, son un constituyente funcional importante de la leche de mama humana, y mantienen la promesa de su uso como una clase de principios activos para terapéuticos que pretende específicamente mejorar la salud intestinal.

Desafortunadamente, hasta la fecha, todavía queda por identificar una fuente de oligosacáridos fucosilados similares a aquellos en la leche humana, por ejemplo, se creía que la leche bovina era rica en oligosacáridos sialilados, pero no fucosilados. De forma interesante, la leche humana solo contiene solo aproximadamente el 20 % de oligosacáridos sialilados.

Actualmente, la única fuente de HMO es la leche humana, y la complejidad estructural de estos oligosacáridos ha impedido su producción comercial. Intentos por reproducir HMO incluyen la síntesis química de 2'- y 3'-fucosil-lactosa como se describe en el documento WO/2005/055944, y en mamíferos no humanos transgénicos (documento US5750176).

También se han caracterizado oligosacáridos de la leche en animales domesticados que incluyen vaca y cabra, aunque son de abundancia generalmente más baja y varían en prevalencia de composiciones de oligosacáridos específicas. Una distinción importante entre la leche humana y otros animales domesticados es la presencia en la última de restos de ácido N-glicolilneuramínico, éstos están ausentes en HMO de acuerdo con la pérdida de la capacidad de los seres humanos para sintetizar este ácido siálico [18]. Estas fuentes de oligosacáridos de la leche no son, por tanto, oligosacáridos prebióticos adecuados.

Prebióticos usados para imitar el efecto prebiótico de HMO incluyen fruto-oligosacáridos (FOS), extraídos de raíces de achicoria y galacto-oligosacáridos (GOS) enzimáticamente sintetizados de galactosa derivada de lácteo [74]. FOS es ampliamente bifidogénico y es utilizado por la mayoría de las bifidobacterias. FOS y GOS se añaden a algunas leches de inicio (por ejemplo, Similac Early Shield en los EE.UU.), y han encontrado uso como prebióticos en una amplia gama de productos alimenticios. Sin embargo, estos prebióticos carecen de la complejidad estructural de HMO, tales como la presencia de restos terminales de fucosa o ácido siálico y, por tanto, es poco probable que proporcionen el espectro completo de bioactividades de HMO. Por tanto, es poco probable que FOS y GOS retengan las funciones de inhibición inmunológica y de patógenos de HMO. Además, los actuales miméticos de oligosacáridos de la leche nutracéuticos, tales como GOS y FOS, no reflejan las conexiones genómicas y fisiológicas entre las bifidobacterias de tipo bebé y HMO; en su lugar, se dirigen a la población bifidobacteriana no específicamente.

Actualmente no existen oligosacáridos prebióticos que puedan imitar completamente las funcionalidades biológicas, estructurales y glucómicas de HMO. Análogos y miméticos de HMO protegerían las superficies de la mucosa en el tubo gastrointestinal del bebé de los patógenos, mientras que al mismo tiempo actuarían de sustrato prebiótico altamente selectivo para dirigir las poblaciones bifidobacterianas de tipo bebé específicas, tales como la presencia de restos terminales de fucosa o ácido siálico y, por tanto, es poco probable que proporcionaran el espectro completo de bioactividades de HMO.

### Breve resumen de la invención

En el presente documento se describen oligosacáridos purificados o aislados (por ejemplo, de una fuente láctea), en los que el oligosacárido es de la Tabla 1 y está seleccionado del grupo que consiste en:

- un oligosacárido que consiste en 3 restos de hexosa (Hex) y 6 restos de N-acetilhexosamina (HexNAc);
- un oligosacárido que consiste en 4 restos de Hex y 3 restos de HexNAc;
- un oligosacárido que consiste en 3 restos de Hex y 4 restos de HexNAc;
- un oligosacárido que consiste en 6 restos de Hex y 2 restos de HexNAc;
- un oligosacárido que consiste en 3 restos de Hex, 4 restos de HexNAc y 1 resto de fucosa (Fuc);
- un oligosacárido que consiste en 4 restos de Hex y 4 restos de HexNAc;
- un oligosacárido que consiste en 3 restos de Hex y 5 restos de HexNAc;
- un oligosacárido que consiste en 4 restos de Hex, 4 restos de HexNAc y 1 resto de Fuc;
- un oligosacárido que consiste en 5 restos de Hex y 4 restos de HexNAc;
- un oligosacárido que consiste en 3 restos de Hex, 5 restos de HexNAc y 1 resto de Fuc;
- un oligosacárido que consiste en 4 restos de Hex y 5 restos de HexNAc;
- un oligosacárido que consiste en 3 restos de Hex y 6 restos de HexNAc;
- un oligosacárido que consiste en 5 restos de Hex, 4 restos de HexNAc y 1 resto de Fuc;
- un oligosacárido que consiste en 4 restos de Hex, 5 restos de HexNAc y 1 resto de Fuc; y
- un oligosacárido que consiste en 3 restos de Hex, 6 restos de HexNAc y 1 resto de Fuc.

Por comodidad, los oligosacáridos enumerados anteriormente pueden describirse además por su relación m/z sodiada del siguiente modo (se proporciona más detalle en la Tabla 1):

- un oligosacárido que tiene una relación carga/masa (m/z) de aproximadamente 1745,228 (masa sodiada), consistiendo el oligosacárido en 3 restos de Hex y 6 restos de HexNAc;
- un oligosacárido que tiene una relación carga/masa (m/z) de aproximadamente 1298,241 (masa sodiada), consistiendo el oligosacárido en 4 restos de Hex y 3 restos de HexNAc;
- un oligosacárido que tiene una relación carga/masa (m/z) de aproximadamente 1339,253 (masa sodiada), consistiendo el oligosacárido en 3 restos de Hex y 4 restos de HexNAc;

- un oligosacárido que tiene una relación carga/masa (m/z) de aproximadamente 1419,225 (masa sodiada),  
 consistiendo el oligosacárido en 6 restos de Hex y 2 restos de HexNAc;  
 un oligosacárido que tiene una relación carga/masa (m/z) de aproximadamente 1485,256 (masa sodiada),  
 consistiendo el oligosacárido en 3 restos de Hex, 4 restos de HexNAc y 1 resto de fucosa (Fuc);  
 5 un oligosacárido que tiene una relación carga/masa (m/z) de aproximadamente 1501,529 (masa sodiada),  
 consistiendo el oligosacárido en 4 restos de Hex y 4 restos de HexNAc;  
 un oligosacárido que tiene una relación carga/masa (m/z) de aproximadamente 1542,251 (masa sodiada),  
 consistiendo el oligosacárido en 3 restos de Hex y 5 restos de HexNAc;  
 un oligosacárido que tiene una relación carga/masa (m/z) de aproximadamente 1647,240 (masa sodiada),  
 10 consistiendo el oligosacárido en 4 restos de Hex, 4 restos de HexNAc y 1 resto de Fuc;  
 un oligosacárido que tiene una relación carga/masa (m/z) de aproximadamente 1663,221(masa sodiada),  
 consistiendo el oligosacárido en 5 restos de Hex y 4 restos de HexNAc;  
 un oligosacárido que tiene una relación carga/masa (m/z) de aproximadamente 1688,24 (masa sodiada),  
 consistiendo el oligosacárido en 3 restos de Hex, 5 restos de HexNAc y 1 resto de Fuc;  
 15 un oligosacárido que tiene una relación carga/masa (m/z) de aproximadamente 1704,23 (masa sodiada),  
 consistiendo el oligosacárido en 4 restos de Hex y 5 restos de HexNAc;  
 un oligosacárido que tiene una relación carga/masa (m/z) de aproximadamente 1809,21 (masa sodiada),  
 consistiendo el oligosacárido en 5 restos de Hex, 4 restos de HexNAc y 1 resto de Fuc;  
 un oligosacárido que tiene una relación carga/masa (m/z) de aproximadamente 1850,227 (masa sodiada),  
 20 consistiendo el oligosacárido en 4 restos de Hex, 5 restos de HexNAc y 1 resto de Fuc; y  
 un oligosacárido que tiene una relación carga/masa (m/z) de aproximadamente 1891,225 (masa sodiada),  
 consistiendo el oligosacárido en 3 restos de Hex, 6 restos de HexNAc y 1 resto de Fuc.

La presente invención proporciona una composición que comprende un oligosacárido purificado de leche o producto  
 25 de leche bovina, de cabra, oveja, búfalo, o de otro mamífero no humano domesticado, en la que el oligosacárido  
 está seleccionado del grupo que consiste en:

- un oligosacárido que consiste en 3 restos de Hex, 4 restos de HexNAc y 1 resto de fucosa (Fuc);  
 un oligosacárido que consiste en 4 restos de Hex, 4 restos de HexNAc y 1 resto de Fuc;  
 30 un oligosacárido que consiste en 5 restos de Hex, 4 restos de HexNAc y 1 resto de Fuc;  
 un oligosacárido que consiste en 4 restos de Hex, 5 restos de HexNAc y 1 resto de Fuc; y  
 un oligosacárido que consiste en 3 restos de Hex, 6 restos de HexNAc y 1 resto de Fuc.

En algunas realizaciones, la composición comprende al menos dos (por ejemplo, al menos 2, al menos 3, al menos  
 35 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, etc.) oligosacáridos seleccionados de seleccionados  
 del grupo que consiste en:

- un oligosacárido que consiste en 3 restos de hexosa (Hex) y 6 restos de N-acetil hexosamina (HexNAc),  
 un oligosacárido que consiste en 4 restos de Hex y 3 restos de HexNAc;  
 40 un oligosacárido que consiste en 3 restos de Hex y 4 restos de HexNAc;  
 un oligosacárido que consiste en 6 restos de Hex y 2 restos de HexNAc;  
 un oligosacárido que consiste en 3 restos de Hex, 4 restos de HexNAc y 1 resto de fucosa (Fuc);  
 un oligosacárido que consiste en 4 restos de Hex y 4 restos de HexNAc;  
 un oligosacárido que consiste en 3 restos de Hex y 5 restos de HexNAc;  
 45 un oligosacárido que consiste en 4 restos de Hex, 4 restos de HexNAc y 1 resto de Fuc;  
 un oligosacárido que consiste en 5 restos de Hex y 4 restos de HexNAc;  
 un oligosacárido que consiste en 3 restos de Hex, 5 restos de HexNAc y 1 resto de Fuc;  
 un oligosacárido que consiste en 4 restos de Hex y 5 restos de HexNAc;  
 un oligosacárido que consiste en 3 restos de Hex y 6 restos de HexNAc;  
 50 un oligosacárido que consiste en 5 restos de Hex, 4 restos de HexNAc y 1 resto de Fuc;  
 un oligosacárido que consiste en 4 restos de Hex, 5 restos de HexNAc y 1 resto de Fuc; y  
 un oligosacárido que consiste en 3 restos de Hex, 6 restos de HexNAc y 1 resto de Fuc.

En algunas realizaciones, la composición comprende uno o más de

- un oligosacárido que consiste en 3 restos de Hex, 4 restos de HexNAc y 1 resto de fucosa (Fuc);  
 un oligosacárido que consiste en 4 restos de Hex, 4 restos de HexNAc y 1 resto de Fuc;  
 un oligosacárido que consiste en 3 restos de Hex, 5 restos de HexNAc y 1 resto de Fuc;  
 un oligosacárido que consiste en 5 restos de Hex, 4 restos de HexNAc y 1 resto de Fuc;  
 60 un oligosacárido que consiste en 4 restos de Hex, 5 restos de HexNAc y 1 resto de Fuc; o  
 un oligosacárido que consiste en 3 restos de Hex, 6 restos de HexNAc y 1 resto de Fuc.

En algunas realizaciones, la composición es un líquido y el contenido del oligosacárido en la composición es de  
 65 0,001-100 g/l o 0,05-10 g/l.

En algunas realizaciones, el contenido de oligosacárido en la composición es de 0,5-1 g/l.

En algunas realizaciones, la composición es un sólido y la concentración del oligosacárido en la composición es de 100 microgramos/l a 25 gramos/l.

5 En algunas realizaciones, la composición está seleccionada del grupo que consiste en un polvo, un comprimido, una cápsula, una pastilla para chupar, un chicle, un producto alimenticio, una bebida complementada, un alimento médico o un producto médico.

10 En algunas realizaciones, la composición comprende además una proteína de leche bovina, una proteína de soja, betalactoglobulina, suero de leche, aceite de soja o almidón.

En algunas realizaciones, dicha bebida complementada es un miembro seleccionado del grupo que consiste en una leche de inicio, leche de continuación, bebida para niños, leche, zumo de frutas y bebida basada en fruta.

15 En algunas realizaciones, el oligosacárido se ha purificado de leche bovina o un producto de leche bovina (que incluye, pero no se limita a, suero de leche).

20 En algunas realizaciones, la composición comprende además un inóculo de una bacteria (por ejemplo, una bacteria probiótica) o un hongo o levadura (por ejemplo, un hongo o levadura probiótico). En algunas realizaciones, la bacteria es una especie de Bifidobacteria. En algunas realizaciones, la bacteria está seleccionada de *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*, *B. breve* y *B. bifidum*.

25 La presente invención también proporciona métodos de obtención de oligosacáridos de la invención. En algunas realizaciones, el método comprende purificar oligosacáridos de leche bovina o un producto de leche bovina (que incluye, pero no se limita a, suero de leche), en el que la purificación comprende inactivar enzimas degradadoras de fucosa, ácido siálico, N-acetilglucosamina, lacto-N-biosa, glucosa y galactosa en leche y/o separar las enzimas de oligosacáridos en la leche, obteniéndose así oligosacáridos. Los oligosacáridos purificados descritos en el presente documento pueden comprender al menos uno o más oligosacáridos de la Tabla 1.

30 La presente invención también proporciona un método de obtención del (de los) oligosacárido(s) de la invención, que comprende purificar el oligosacárido de leche bovina. En algunas realizaciones, la purificación comprende separar enzimas degradadoras de fucosa, ácido siálico, N-acetilglucosamina, lacto-N-biosa, glucosa y galactosa en leche del oligosacárido.

35 La presente invención también proporciona métodos de modificación del (de los) oligosacárido(s) purificado(s) de la invención, que comprenden poner en contacto el oligosacárido con al menos una enzima modificadora, añadiendo o eliminando así uno o más restos químicos del oligosacárido purificado, generando así un oligosacárido modificado. En algunas realizaciones, la enzima modificadora está seleccionada del grupo que consiste en una fucosidasa, fucosiltransferasa, sialidasa, sialiltransferasa, una glucosidasa y una glucosiltransferasa. En algunas realizaciones, el método comprende además poner en contacto el oligosacárido con al menos una enzima modificadora, añadiendo o  
40 eliminando así un resto químico del oligosacárido, generándose así un oligosacárido modificado. En algunas realizaciones, la enzima modificadora está seleccionada del grupo que consiste en una fucosidasa, fucosiltransferasa, sialidasa, sialiltransferasa, una glucosidasa y una glucosiltransferasa. En algunas realizaciones, el oligosacárido comprende un extremo de HexNAc y la enzima modificadora añade uno, dos o varios restos de GDP-fucosa al extremo de HexNAc. En algunas realizaciones, el oligosacárido comprende un extremo de HexNAc y la  
45 enzima modificadora añade uno, dos o varios restos de CMP-ácido siálico al extremo de HexNAc. En algunas realizaciones, el oligosacárido comprende un dímero HexNAc-Fuc y la enzima modificadora escinde el dímero del resto del oligosacárido. En algunas realizaciones, el resto del oligosacárido se combina con galactooligosacáridos (GOS) y/o fructooligosacáridos (FOS) para formar una composición prebiótica.

50 En algunas realizaciones, el método comprende además formular el (los) oligosacárido(s) u oligosacárido(s) modificado(s) en una composición para consumo humano o animal. En algunas realizaciones, el producto alimenticio es un polvo, un comprimido, una cápsula, una pastilla para chupar, un chicle, un producto alimenticio, una bebida complementada o un alimento médico.

55 También en el presente documento se describen métodos que comprenden administrar una cantidad de la composición descrita anteriormente a un individuo. El método descrito en el presente documento puede prevenir, tratar o mejorar una afección en el individuo, comprendiendo el método administrar una cantidad suficiente de la composición al individuo para prevenir, tratar o mejorar la afección, en los que el individuo tiene o está en mayor riesgo que la población general de tener después la afección, y la afección está seleccionada del grupo que consiste  
60 en

65 diarrea;  
enterocolitis necrotizante;  
síndrome del intestino irritable;  
reacción alérgica;  
trastorno del espectro autista (TEA); y

presencia de *Enterococcus faecalis*, *Clostridium difficile* y *Salmonella enterica*, *Salmonella typhimurium*, *Vibrio cholerae*, *E. coli* O157:H7, *Clostridium perfringens*, *Vibrio cholerae*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Enterococcus faecalis*, *Eubacteria rectales*, otras bacterias enteropatógenas, especies de *Shigella* en el individuo.

5 La presente invención proporciona una composición que comprende un oligosacárido purificado de la presente invención para su uso en un método de tratamiento de una afección en un individuo, en el que la afección está seleccionada de

10 diarrea;  
 enterocolitis necrotizante;  
 síndrome del intestino irritable;  
 reacción alérgica;  
 trastorno del espectro autista (TEA); y  
 15 presencia de *Enterococcus faecalis*, *Clostridium difficile* y *Salmonella enterica*, *Salmonella typhimurium*, *Vibrio cholerae*, *E. coli* O157:H7, *Clostridium perfringens*, *Vibrio cholerae*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Enterococcus faecalis*, *Eubacteria rectales*, otras bacterias enteropatógenas, especies de *Shigella* en el individuo.

20 En algunas realizaciones, el oligosacárido estimula selectivamente la producción de una secreción bifidobacteriana que modula la salud intestinal en el individuo; mejora al menos un biomarcador de la salud intestinal en el individuo; o aumenta la colonización intestinal y persistencia de bacterias probióticas en el individuo.

25 En algunas realizaciones, la secreción está seleccionada del grupo que consiste en un antibiótico, bacteriocina, proteína, péptido, glucoproteína, glucopéptido, lípido, glicolípido y un exopolisacárido. Estas secreciones también pueden modular señales generadas por células epiteliales enteroendocrinas y del intestino con efectos locales y sistémicos sobre la salud del hospedador.

30 En algunas realizaciones, el biomarcador es una citocina o quimiocina. En algunas realizaciones, el biomarcador es una citocina o quimiocina inflamatoria. En algunas realizaciones, la citocina está seleccionada del grupo que consiste en IL-4, IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-10 e INF- $\gamma$ .

35 En algunas realizaciones, el individuo es un ser humano. En algunas realizaciones, el individuo es un animal no humano.

En algunas realizaciones, se administran bacterias, levaduras u hongos como parte de o conjuntamente con la composición. En algunas realizaciones, la bacteria es una especie de Bifidobacteria. En algunas realizaciones, la bacteria está seleccionada del grupo que consiste en *Bifidobacterium longum* subsp. *Infantis*, *B. breve* y *B. bifidum*.

40 También en el presente documento se describen métodos que comprenden administrar una cantidad de la composición como se ha descrito anteriormente (es decir, que comprende al menos un oligosacárido como se ha descrito anteriormente purificado de leche bovina o productos de leche) a un individuo. El método descrito en el presente documento puede prevenir, tratar o mejorar una afección en el individuo, comprendiendo el método administrar una cantidad suficiente de la composición al individuo para prevenir, tratar o mejorar la condición, en los  
 45 que el individuo tiene o está en mayor riesgo que la población general de tener después la afección, y la afección está seleccionada del grupo que consiste en

50 diarrea;  
 enterocolitis necrotizante;  
 síndrome del intestino irritable;  
 reacción alérgica;  
 trastorno del espectro autista (TEA); y  
 55 presencia de *Enterococcus faecalis*, *Clostridium difficile* y *Salmonella enterica*, *Salmonella typhimurium*, *Vibrio cholerae*, *E. coli* O157:H7, *Clostridium perfringens*, *Vibrio cholerae*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Enterococcus faecalis*, *Eubacteria rectales*, otras bacterias enteropatógenas, especies de *Shigella* en el individuo.

60 En algunas realizaciones, el oligosacárido: estimula selectivamente la producción de una secreción bifidobacteriana que modula la salud intestinal en el individuo; mejora al menos un biomarcador de la salud intestinal en el individuo; o aumenta la colonización intestinal y persistencia de bacterias probióticas en el individuo.

65 En algunas realizaciones, la secreción está seleccionada del grupo que consiste en un antibiótico, bacteriocina, proteína, péptido, glucoproteína, glucopéptido, lípido, glucolípido y un exopolisacárido. Estas secreciones también pueden modular señales generadas por células epiteliales enteroendocrinas e intestinales con efectos locales y sistémicos sobre la salud del hospedador.

En algunas realizaciones, el biomarcador es una citocina o quimiocina. En algunas realizaciones, el biomarcador es una citocina inflamatoria o quimiocina. En algunas realizaciones, la citocina está seleccionada del grupo que consiste en IL-4, IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-10 e INF- $\gamma$ .

5 En algunas realizaciones, el individuo es un ser humano. En algunas realizaciones, el individuo es un animal no humano.

10 En algunas realizaciones, se administra una bacteria como parte de o conjuntamente con la composición. En algunas realizaciones, la bacteria es una especie de Bifidobacteria. En algunas realizaciones, la bacteria está seleccionada del grupo que consiste en *Bifidobacterium longum* sbsp. *infantis*, *B. brev* y *B. bifidum*.

Otras realizaciones serán evidentes de una lectura completa de este documento.

### Definiciones

15 Como se usa en el presente documento, el término "oligosacárido" se refiere a hidratos de carbono poliméricos que contienen 3 a 20 monosacáridos covalentemente unidos mediante enlaces glucosídicos. En algunas realizaciones, los oligosacáridos se purifican de leche bovina/suero de leche/queso/productos lácteos, por ejemplo, se purifica de enzimas degradadoras de oligosacáridos en leche bovina/suero de leche/queso/productos lácteos.

20 "Masa sodiada" se refiere a un oligosacárido analizado en el modo positivo usando sodio para formar el aducto  $(M+Na)^+$  (sodio = Na;  $m/z$  22,989). El análisis de espectrometría de masas MALDI FT ICR de glucanos nativos (sin derivatizar) puede adquirirse usando o bien iones positivos o negativos. Los oligosacáridos que llevan cargas negativas tales como aquellos que contiene ácido N-acetilneuramínico (ácido siálico) producen señal más intensa en el modo de análisis de detección de iones negativos que positivos debido a que fácilmente se desprotonan formando  $[M-H]^-$ . En cambio, los oligosacáridos neutros (el tipo sin ácido siálico) son más difíciles de detectar en modo negativo debido a que su eficiencia de ionización es más baja, de hecho, los oligosacáridos neutros tienen una baja tendencia a formar  $[M-H]^-$ . Por tanto, para mejorar la detección de oligosacáridos neutros, puede formarse un aducto de metal-hidrato de carbono usando sodio, y entonces se realizan los análisis en modo de detección de iones negativos, formando el aducto  $[M+Na]^+$ . Los resultados de este ensayo producen valores de  $m/z$  sodiado (por ejemplo, tales como los presentes en la Tabla 1 a continuación). La masa neutra se calcula a partir de valores sodiados restando 22,989 unidades (MW del ión sodio).

35 "Lácteo" se refiere a leche o productos de leche o subproductos de leche de una vaca, cabra, oveja, búfalo u otro mamífero no humano domesticado.

"Hexosa (Hex)" representa un resto de glucosa o galactosa o manosa. Estas moléculas tienen una  $m/z$  monoisotópica de 162,0528.

40 "Fucosa (Fuc)" representa un resto de desoxihexosa. Esta molécula tiene una  $m/z$  monoisotópica de 146,0579.

"HexNAc" representa un resto de N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina. Esta molécula tiene una  $m/z$  monoisotópica de 203,0794.

45 "NeuAc" representa un resto de ácido N-acetilneuramínico (ácido siálico). Esta molécula tiene una  $m/z$  monoisotópica 291,0954.

### Breve descripción de los dibujos

50 La Figura 1 ilustra un espectro de masas de oligosacáridos purificados. El espectro de masas se registró en modo de ionización positivo.

55 La Figura 2 ilustra el crecimiento de *B. infantis* y *Clostridium perfringens* en oligosacáridos de leche bovina (BMO).

60 La Figura 3 ilustra el crecimiento de patógenos seleccionados en BMO. Figura 3A) Lactosa - Placa de MacConkey, crecimiento observado para *Salmonella* con una inserción de operón lac y *E. coli* positivo para el operón lac, crecimiento representado por las líneas rojas sobre la placa de agar de BMO, como se muestra en 1,3,5. Figura 3B) BMO - MacConkey (2 g por 100 ml) crecimiento observado para *Salmonella* con una inserción de operón lac y *E. coli* positivo para el operón lac, crecimiento representado por líneas rojas en la placa de agar de MacConkey de BMO, como se muestra en 1,3,5. La permeasa del operón lac puede transportar trómeros y tetrómeros de BMO. *Yersinia enterocolitica* fue negativa en lactosa y modestamente positiva en BMO, todas las otras bacterias fueron negativas en ambos medios. Se suspendieron BMO a 1 g/10 ml de agua estéril, se añadió NaOH 10 N hasta que el pH fue 7. Se usó la solución de BMO en un medio de MacConkey para generar placas de agar.

1. *E. coli* K12
2. *E. coli* K12 (DH5alfa, lac menos)
3. *E. coli* O157:H7
4. *Salmonella typhimurium*
5. *Salmonella typhimurium* + operón lac
6. *Salmonella typhimurium*
7. *Salmonella typhimurium*
8. *Listeria monocytogenes*
9. *Yersinia enterocolitica*
10. *Vibrio cholerae*
11. *Vibrio cholerae*

## Descripción detallada

### I. Introducción

Se describen métodos de tratamiento de infecciones y aumento de poblaciones de bifidobacterias usando análogos de oligosacárido de la leche. Análogos y miméticos que se parecen mucho a la complejidad glucómica de HMO serían la fuente prebiótica preferida para todos los productos nutricionales para bebés y permitiría que los beneficios para la salud que los oligosacáridos de la leche proporcionan para los bebés también pudieran ponerse a disposición para individuos de todas las edades. Los inventores han descubierto sorprendentemente que la leche bovina contiene varios oligosacáridos que no se sabía previamente que se producían en la leche bovina. De hecho, algunos de los oligosacáridos no eran conocidos antes en absoluto. Más sorprendentemente, entre estos oligosacáridos recién descubiertos está un subconjunto de oligosacáridos que contienen fucosa. Se proporcionan oligosacáridos purificados, composiciones que comprenden los oligosacáridos purificados y métodos de purificación, manipulación y uso de los oligosacáridos y composiciones. En algunas realizaciones, las composiciones descritas en el presente documento incluyen uno o más componentes no de la leche, por ejemplo, una proteína no de la leche, lípido no de la leche o hidrato de carbono no de la leche.

Los inventores también han encontrado que enzimas que se producen naturalmente en leche destruyen los oligosacáridos descritos en el presente documento. Por tanto, los inventores han descubierto que los oligosacáridos pueden purificarse separando los oligosacáridos en la leche bovina de las enzimas degradadoras, permitiendo así la purificación de los oligosacáridos de la leche bovina. Por tanto, se describen métodos de generación de oligosacáridos purificados de la leche bovina.

En particular, los inventores también han encontrado que al menos algunos de los oligosacáridos descubiertos son capaces de soportar selectivamente el crecimiento de bacterias deseables ("probióticas"), mientras que no soportan el crecimiento de bacterias patógenas. Así, se cree que los oligosacáridos descubiertos, además de las formas modificadas de los mismos, serán útiles en prevenir, tratar o mejorar un gran número de afecciones para las que el crecimiento bacteriano probiótico es beneficioso.

### II. Oligosacáridos identificados en productos de leche bovina (BMO)

La Tabla 1 resume los oligosacáridos identificados en leche bovina y suero de leche y proporciona el número de diferentes unidades monoméricas en los oligosacáridos descubiertos, su relación carga con respecto a masa experimental usando aductos sodiados (es decir, donde los iones sodio han sido usados para analizar oligosacáridos en modo de ionización positivo) y la masa neutra (calculada restando el ión sodio) de los oligosacáridos analizados por espectrometría de masas, y su grado de polimerización (DP). La composición monomérica de iones parentales sodiados se obtuvo por disociación inducida por colisión-espectrometría de masas en tándem.

Masa neutral (m/z) calculada	m/z sodiada [M+Na] <sup>+</sup> experimental	Hexosa	HexNAc	Fucosa	NeuAc	DP
488,174	511,163	2	0	1	0	3
504,169	527,133	3	0	0	0	3
545,195	568,154	2	1	0	0	3
633,210	656,156	2	0	0	1	3
666,223	689,211	4	0	0	0	4
691,254	714,243	2	1	1	0	4
707,253	730,179	3	1	0	0	4
748,282	771,197	2	2	0	0	4
795,266	818,230	3	0	0	1	4
812,281	835,269	4	0	1	0	5
828,279	851,264	5	0	0	0	5
853,307	876,296	3	1	1	0	5

Masa neutral (m/z) calculada	m/z sodiada [M+Na] <sup>+</sup> experimental	Hexosa	HexNAc	Fucosa	NeuAc	DP
869,306	892,196	4	1	0	0	5
910,346	933,213	3	2	0	0	5
990,326	1013,317	6	0	0	0	6
1031,355	1054,343	5	1	0	0	6
1038378	1061,238	2	2	0	1	5
1072,379	1095,219	4	2	0	0	6
1113,408	1136,234	3	3	0	0	6
1152,381	1175,37	7	0	0	0	7
1234,434	1257,229	5	2	0	0	7
1259,466	1282,454	3	3	1	0	7
1275,461	1298,241	4	3	0	0	7
1362,469	1385,433	4	2	0	1	7
1314,434	1337,193	8	0	0	0	8
1316,487	1339,253	3	4	0	0	7
1396,487	1419,225	6	2	0	0	8
1404,496	1427,455	3	3	0	1	7
1462,545	1485,256	3	4	1	0	8
1476,486	1499,184	9	0	0	0	9
1478,540	1501,529	4	4	0	0	8
1519,567	1542,251	3	5	0	0	8
1524,522	1547,559	5	2	0	1	8
1566,548	1589,507	4	3	0	1	8
1624,598	1647,240	4	4	1	0	9
1640,593	1663,221	5	4	0	0	9
1665,625	1688,24	3	5	1	0	9
1681,620	1704,23	4	5	0	0	9
1722,646	1745,228	3	6	0	0	9
1786,651	1809,21	5	4	1	0	10
1827,677	1850,227	4	5	1	0	10
1868,704	1891,225	3	6	1	0	10

"DP" se refiere al grado de polimerización, es decir, el número de unidades (monosacáridos) de oligosacárido.

En el presente documento se describen uno o más oligosacáridos purificados como se expone en la Tabla 1, además de composiciones que contienen el uno o más oligosacáridos purificados.

- 5 Como se muestra en los ejemplos, cada uno de los oligosacáridos descritos en la Tabla 1 puede purificarse a partir de productos de leche bovina, que incluyen, pero no se limitan a leche, suero de leche, queso y otros productos lácteos. En vista de la abundancia de leche bovina y otros productos lácteos en la economía mundial, se tiene previsto que la forma más comercialmente eficiente para producir los oligosacáridos purificados descritos en el presente documento sea por purificación de leche bovina y otras corrientes lácteas. Por tanto, un método de purificación de un oligosacárido, que incluye, pero no se limita a, uno o más oligosacáridos como se describe en la Tabla 1, se realiza purificando el (los) oligosacárido(s) de leche bovina. "Oligosacárido purificado" se refiere a un oligosacárido que ha sido al menos enriquecido en el oligosacárido en comparación con uno o varios de otros componentes en la leche. En algunas realizaciones, el (los) oligosacárido(s) están sustancialmente purificados, por ejemplo, de forma que otros oligosacáridos no de la leche estén sustancialmente ausentes. En algunas realizaciones, al menos un oligosacárido en la composición purificada está a una concentración de al menos 0,001, 0,001, 0,1, 1, 10 o 100 g/l.

Las glándulas mamarias bovinas contienen varias enzimas, llamadas glucosidasas, cuya función es hidrolizar gradualmente los glucanos (es decir, oligosacáridos) a restos más pequeños. Los oligosacáridos de alto peso molecular (incluyendo aquellos que contienen fucosa) son degradados para generar los oligosacáridos más pequeños/de núcleo correspondientes que han sido previamente identificados en leche bovina. Por tanto, los oligosacáridos de alto peso molecular como se describen en la Tabla 1 no son fácilmente detectables en leche líquida (por ejemplo, leche líquida comprada en tienda). En algunas realizaciones, el método de purificación del (de los) oligosacárido(s) de la leche bovina comprende secuestrar, separar y/o inactivar las glucosidasas y/u otras enzimas degradadoras de fucosa, ácido siálico, N-acetilglucosamina, lacto-N-biosa, glucosa y galactosa del (de los) oligosacárido(s) diana. Esto puede lograrse, por ejemplo, por técnicas de filtración convencional de tamaño apropiado para eliminar selectivamente estas moléculas del resto de los componentes de la leche usando membranas de ultrafiltración. En algunas realizaciones, las membranas usadas tienen un corte de peso molecular (MWCO) de 30 a 70 kDa. En algunas realizaciones, las membranas tienen un MWCO de 40 a 50 kDa. Similarmente, técnicas tales como diálisis, ultrafiltración combinada con diafiltración permiten la purificación de los oligosacáridos

en la leche bovina como se describe en el presente documento.

Alternativamente, pueden usarse métodos enzimáticos para sintetizar los oligosacáridos de la presente invención. En general, cualquier enzima biosintética o enzima catabólica de oligosacáridos (transcurriendo la reacción a la inversa) que convierta un sustrato en cualquiera de los oligosacáridos descritos en el presente documento (o sus productos intermedios) puede usarse en la práctica de la presente invención. En algunas realizaciones, los componentes sacarídicos de los oligosacáridos de la leche, tales como glucosa, galactosa, lactosa, N-acetilglucosamina, N-acetilgalactosamina, fucosa, ácidos siálicos, pueden combinarse usando glucosiltransferasas para volver a crear análogos de oligosacáridos de leche humana.

Alternativamente, pueden usarse métodos químicos convencionales para la síntesis orgánica *de novo* de o conversión de oligosacáridos preexistentes en los oligosacáridos descritos en el presente documento. Véase, por ejemplo, March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure, 5ª Edición.

Los oligosacáridos purificados de la invención, si se purifican a partir de leche bovina o de reacciones de síntesis, pueden tener cualquier concentración según se desee. En algunas realizaciones, un oligosacárido de la Tabla 1 es al menos 1, 10, 100 microgramos/l, o al menos 1 gramo o 10 gramo/l. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la concentración de oligosacárido (es decir, un único oligosacárido o una mezcla de dos o más oligosacáridos como se encuentra en la Tabla 1) es de 1, 10, 100 microgramos/l a 25 gramos/l.

En algunas realizaciones, los oligosacáridos de un producto lácteo (por ejemplo, leche) están seleccionados para un grado particular de polimerización (DP). Por ejemplo, en algunas realizaciones, los oligosacáridos purificados están enriquecidos para aquellos que tienen un DP superior a 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o más. En algunas realizaciones, los oligosacáridos purificados están enriquecidos para aquellos que tienen un DP entre 3-10, 3-8, 4-8, 4-10, 5-10, 6-10, etc.

Puede lograrse la selección de DP particulares usando cualquier método disponible, por ejemplo, usando extracción en fase sólida. Por ejemplo, después de filtrar la leche/suero de leche por filtración en membrana, los oligosacáridos se purifican de la leche/suero de leche por extracción en fase sólida usando cartuchos de carbono grafitizados-polipropileno no porosos. En algunas realizaciones, los oligosacáridos de baja masa de DP 2 a DP 6 se eluyen de los cartuchos usando una solución 90:10 de agua desionizada-acetonitrilo; y los oligosacáridos más complejos de alta masa de DP 7 a DP 10 son secuencialmente eluidos de los cartuchos usando una solución 80:20 de agua desionizada-acetonitrilo.

En algunas realizaciones, los oligosacáridos fucosilados (por ejemplo, en un aspecto de DP 7 a DP 10) se purifican de un producto lácteo usando una solución 80:20 de agua desionizada-acetonitrilo. Los oligosacáridos fucosilados son de particular interés debido a que en algunas realizaciones son estructuralmente similares a los oligosacáridos de la leche humana.

### III. Formulaciones de BMO

Las composiciones de oligosacáridos de la presente invención pueden administrarse, ya sea como purificadas de la leche o versiones modificadas como se trata además más adelante) como una formulación prebiótica (es decir, sin bacterias) o como una formulación simbiótica (es decir, con bacterias deseables tales como bifidobacterias como se describe en el presente documento). En general, puede usarse cualquier alimento o bebida que pueda ser consumido por bebés o adultos humanos o animales para preparar formulaciones que contienen las composiciones prebióticas y simbióticas de la presente invención. Alimentos a modo de ejemplo incluyen aquellos con una consistencia semilíquida para permitir la fácil y uniforme dispersión de las composiciones prebióticas y simbióticas de la invención. Sin embargo, también pueden usarse otras consistencias (por ejemplo, polvos, líquidos, etc.) sin limitación. Por consiguiente, tales artículos alimenticios incluyen, sin limitación, productos basados en lácteos tales como queso, requesón, yogurt y helado. Frutas y verduras procesadas, que incluyen aquellas dirigidas a lactantes/niños, tales como compota de manzana o verduras tamizadas (por ejemplo, guisantes y zanahorias, etc.), también son adecuadas para su uso en combinación con las composiciones prebióticas y simbióticas de la presente invención. Tanto los cereales para bebés tales como cereales basados en arroz o avena, como los cereales para adultos tales como Musilix, también son adecuados para su uso en combinación con los oligosacáridos de la presente invención. Además de los alimentos dirigidos al consumo humano, piensos para animales también pueden ser complementados con las composiciones prebióticas y simbióticas de la invención.

Alternativamente, las composiciones prebióticas y simbióticas de la invención pueden usarse para complementar una bebida. Ejemplos de tales bebidas incluyen, sin limitación, leche de inicio, leche de continuación, bebida para niños, leche, leche fermentada, zumo de frutas, bebida basada en frutas y bebidas isotónicas. Se conocen en la técnica muchas leches de inicio y para niños y están comercialmente disponibles, que incluyen, por ejemplo, Carnation Good Start (Nestle Nutrition Division; Glendale, Calif.) y Nutrish A/B producida por Mayfield Dairy Farms (Athens, Tenn.). Otros ejemplos de leches de iniciación o para bebés incluyen las desveladas en la patente de EE.UU. N.º 5.902.617. Otras formulaciones beneficiosas de las composiciones de la presente invención incluyen la complementación de leches de animal, tales como leche de vaca.

Alternativamente, las composiciones prebióticas y probióticas de la presente invención pueden formularse en píldoras o comprimidos o encapsuladas en cápsulas, tales como cápsulas de gelatina. Las formas de comprimido pueden opcionalmente incluir, por ejemplo, uno o más de lactosa, sacarosa, manitol, sorbitol, fosfatos de calcio, almidón de maíz, almidón de patata, celulosa microcristalina, gelatina, dióxido de silicio coloidal, talco, estearato de magnesio, ácido esteárico, y otros excipientes, colorantes, cargas, aglutinantes, diluyentes, agentes de tamponamiento, agentes humidificantes, conservantes, aromatizantes, colorantes, agentes disgregantes y vehículos farmacéuticamente compatibles. Las formas de pastilla para chupar o caramelo pueden comprender las composiciones en un aroma, por ejemplo, sacarosa, además de pastillas que comprenden las composiciones en una base inerte, tal como gelatina y glicerina o sacarosa y emulsiones de goma arábiga, geles, y similares que contienen, además del principio activo, vehículos conocidos en la técnica. Las formulaciones prebióticas o simbióticas también pueden contener cargas y sustancias de relleno de complementos alimenticios convencionales tales como, por ejemplo, harina de arroz.

En algunas realizaciones, la composición prebiótica o simbiótica comprenderá además una proteína no humana, lípido no humano, hidrato de carbono no humano, u otro componente no humano. Por ejemplo, en algunas realizaciones, las composiciones de la invención comprenden una proteína de leche bovina (u otra no humana), una proteína de soja, una proteína de arroz, betalactoglobulina, suero de leche, aceite de soja o almidón. En algunas realizaciones, la composición prebiótica o simbiótica comprenderá además una proteína no bovina, lípido no bovino, hidrato de carbono no bovino, u otro componente no bovino.

Las dosis de las composiciones prebióticas y simbióticas de la presente invención variarán dependiendo de los requisitos del individuo y tendrán en cuenta factores tales como la edad (bebé frente a adulto), peso y motivos para la pérdida de las beneficiosas bacterias intestinales (por ejemplo, terapia con antibióticos, quimioterapia, enfermedad, o edad). La cantidad administrada a un individuo, en el contexto de la presente invención, debe ser suficiente para establecer la colonización del intestino con bacterias beneficiosas con el tiempo. El tamaño de la dosis también será determinado por la existencia, naturaleza y grado de cualquier efecto secundario adverso que pueda acompañar a la administración de una composición prebiótica o simbiótica de la presente invención. En algunas realizaciones, el intervalo de dosis será eficaz como un complemento alimenticio y para restablecer bacterias beneficiosas en el tubo digestivo. En algunas realizaciones, la dosis de un oligosacárido(s) oscila de aproximadamente 1 microgramo/l a aproximadamente 25 gramos/l de oligosacáridos.

Las formulaciones prebióticas o simbióticas de la invención pueden administrarse a cualquier individuo en necesidad de las mismas. En algunas realizaciones, el individuo es un bebé o niño. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el individuo tiene menos de, por ejemplo, 3 meses, 6 meses, 9 meses, un año, dos años o tres años de edad. En algunas realizaciones, el individuo es un adulto. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el individuo tiene más de 50, 55, 60, 65, 70 o 75 años de edad. En algunas realizaciones, el individuo es inmunodeficiente (por ejemplo, el individuo tiene SIDA o está recibiendo quimioterapia).

Bifidobacterias a modo de ejemplo que pueden incluirse en las composiciones probióticas de la invención incluyen, pero no se limitan a, *B. longum* subsp. *infantis*, *B. longum* subsp. *longum*, *B. breve* y *B. adolescentis*. El *Bifidobacterium* usado dependerá en parte del consumidor objetivo. Dosis de bifidobacterias a modo de ejemplo para formulaciones probióticas incluyen, pero no se limitan a,  $10^4$  a  $10^{12}$  unidades formadoras de colonias (UFC) por dosis. Un intervalo ventajoso adicional es  $10^5$  a  $10^{10}$  UFC.

Por ejemplo, en algunas realizaciones, se administra *B. longum* subsp. *infantis* con las composiciones de oligosacárido de la invención a un bebé o niño pequeño (por ejemplo, menos de 5 años de edad). En algunas realizaciones, *B. longum* subsp. *infantis* se incluye en, o conjuntamente con, una leche de inicio o leche de continuación. En algunas realizaciones, las composiciones se administran a un adulto o una persona anciana. En algunas realizaciones, la persona tiene al menos 50, 60, 70 u 80 años de edad.

Se apreciará que puede ser ventajoso que algunas aplicaciones incluyan otros factores bifidogénicos en las formulaciones de la presente invención. Tales componentes adicionales pueden incluir, pero no se limitan a, fructooligosacáridos tales como Raftilose (Rhone-Poulenc, Cranbury, N.J.), inulina (Imperial Holly Corp., Sugar Land, Tex.) y Nutraflora (Golden Technologies, Westminster, Colo.), además de lactosa, xilooligosacáridos, oligosacáridos de soja, lactulosa/lactitol, entre otros. En algunas aplicaciones, pueden incluirse otras bacterias beneficiosas, tales como *Lactobacillus*, en las formulaciones.

En algunas realizaciones, las composiciones de la invención se administran a un ser humano o animal en necesidad de las mismas. Por ejemplo, en algunas realizaciones, las composiciones de la invención se administran a una persona o animal que tiene al menos una afección seleccionada del grupo que consiste en síndrome inflamatorio intestinal, estreñimiento, diarrea, diarrea del viajero, diarrea inducida por antibióticos, infecciones por *Clostridium difficile* (CDI), enteritis, colitis, enfermedad de Crohn, cáncer de colon, reacción alérgica, trastorno intestinal funcional (FBD), síndrome del intestino irritable (IBS), enfermedad del intestino irritable (IBD), exceso de bacterias reductoras de sulfato, enfermedad inflamatoria del intestino (IBD), trastorno del espectro autista (TEA), enterocolitis necrotizante (NEC) y colitis ulcerosa. El síndrome del intestino irritable (IBS) se caracteriza por dolor abdominal y molestia, hinchazón y función intestinal alterada, estreñimiento y/o diarrea. Existe tres grupos de IBS: IBS predominante en

estreñimiento (C-IBS), IBS alternante (A-IBS) e IBS predominante en diarrea (D-IBS). Las composiciones de la invención son útiles, por ejemplo, para reprimir o prolongar los periodos de remisión en pacientes ulcerosos. Las composiciones de la invención pueden administrarse para tratar o prevenir cualquier forma de trastorno intestinal funcional (FBD), y en particular síndrome del intestino irritable (IBS), tal como IBS predominante en estreñimiento (C-IBS), IBS alternante (A-IBS) e IBS predominante en diarrea (D-IBS); estreñimiento funcional y diarrea funcional. FBD es un término general para una gama de trastornos gastrointestinales que son crónicos y semicrónicos y que están asociados a dolor intestinal, función intestinal perturbada y alteración social.

En otra realización de la invención, las composiciones de la invención se administran para aquellos en necesitan estimulación del sistema inmunitario y/o para la promoción de resistencia a infecciones bacterianas o por levadura, por ejemplo, candidiasis o enfermedades inducidas por bacterias reductoras de sulfato, *Enterococcus faecalis*, *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, *Salmonella enterica*, *Vibrio cholerae*, *E. coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Enterococcus faecalis*, *Eubacteria rectales*, otras bacterias enteropatógenas, o especie de *Shigella* en el intestino, reduciendo así la colonización del intestino por al menos una de las bacterias anteriormente enumeradas.

En algunas realizaciones, las composiciones que comprenden los oligosacáridos descritos en el presente documento (por ejemplo, en la Tabla 1 o purificados de otro modo de leche bovina) se administran a un individuo, aumentando así la colonización intestinal y persistencia de bacterias probióticas en el individuo. En algunas realizaciones, las composiciones que comprenden los oligosacáridos descritas en el presente documento (por ejemplo, en la Tabla 1 o purificados de otro modo de leche bovina) se administran a un individuo, estimulando así selectivamente la producción de secreciones probióticas (que incluyen, pero no se limitan a, bifidobacterianas) en el individuo. Ejemplos de tales secreciones incluyen, pero no se limitan a, antibióticos, bacteriocinas, u otros moduladores de la salud intestinal.

En algunas realizaciones, las composiciones que comprenden los oligosacáridos descritos en el presente documento (por ejemplo, en la Tabla 1 o purificados de otro modo de leche bovina) se administran a un individuo, mejorándose así los biomarcadores de la salud intestinal en el individuo. Ejemplos de biomarcadores de la salud intestinal incluyen, pero no se limitan a, disminución en citocinas y quimiocinas inflamatorias. Marcadores a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, IL-4, IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-10 e INF- $\gamma$ .

#### **IV. Modificación de BMO**

El análisis de los datos de composición y estructurales de los oligosacáridos de leche bovina (BMO) (Tabla 1) ha revelado sorprendentemente que estas composiciones pueden ser además manipuladas para crear estructuras idénticas a oligosacáridos encontrados en la leche humana. Así, en algunas realizaciones, pueden realizarse una o más reacciones enzimáticas en uno o más oligosacáridos de leche bovina (por ejemplo, como se describe en la Tabla 1) para generar un oligosacárido modificado. En algunas realizaciones, los oligosacáridos modificados son idénticos a aquellos que se producen en leche humana.

Alternativamente, los BMO, y especialmente aquellos que contienen restos fucosilados y sialilados, modificados como se describe en el presente documento, o sin modificar, pueden añadirse a mezclas de oligosacáridos existentes (que incluyen, pero no se limitan a, GOS o FOS) para crear clases de mezclas prebióticas de oligosacáridos que imitan más estrechamente los HMO.

El análisis de la composición monomérica de BMO (Tabla 1) ha revelado sorprendentemente un oligosacárido con m/z 730,25, que tiene 3 Hex y 1 HexNAc y un grado de polimerización (DP) de 4; y otro con m/z 1095,38, que comprende 4 Hex y 2 HexNAc y DP de 6, que son idénticos a dos de las estructuras de HMO más abundantes de leche humana reunida. Por tanto, los BMO pueden usarse como una fuente útil de al menos dos oligosacáridos que previamente solo se sabía que existían en leche humana.

Pueden generarse composiciones de HMO adicionales empleando una fucosiltransferasa y haciendo reaccionar una unidad monomérica individual de UGD-Fucosa con el BMO con una m/z 730,25 y 1095,38. Otra composición más útil de HMO puede obtenerse de un sustrato de BMO mediante adición de un dímero HexNAc-Fuc individual por la acción de glucosiltransferasas a BMO con m/z 892,34 y 1257,42.

Puede generarse otra composición más útil empleando una fucosiltransferasa y añadiendo uno, dos o varios restos de GDP-fucosa a los extremos de HexNAc de BMO, generándose así análogos de HMO y composiciones de BMO fucosilados (BMO-f). En algunas realizaciones, estos oligosacáridos modificados se añaden a mezclas de oligosacáridos existentes (que incluyen, pero no se limitan a, GOS o FOS).

Puede generarse otra composición útil usando una sialiltransferasa y añadiendo uno, dos o varios CMP-ácido siálico a los extremos de HexNAc de BMO para generar composiciones de BMO sialilados (BMO-s). En algunas realizaciones, estos oligosacáridos modificados se añaden a mezclas de oligosacáridos existentes (que incluyen, pero no se limitan a, GOS o FOS).

Puede generarse otra composición útil escindiendo enzimáticamente de BMO un dímero que comprende HexNAc-Fuc. En algunas realizaciones, estos oligosacáridos modificados se añaden a mezclas de oligosacáridos existentes (que incluyen, pero no se limitan a, GOS o FOS).

## 5 Ejemplos

Los siguientes ejemplos se ofrecen para ilustrar, pero no para limitar, la invención reivindicada.

### Ejemplo 1:

#### 10 Análisis de espectrometría de masas de resonancia ión-ciclotrón con transformada de Fourier por desorción/ionización láser asistida por matriz (EM MALDI FT-ICR) de oligosacáridos en leche bovina

15 Se realizó análisis de oligosacáridos usando un espectrómetro de masas ProMALDI-FT-ICR (IonSpec, Lake Forest, CA) equipado con un imán superconductor de 7,0 Tesla, acumulación de ión de hexapolo y equipado con un láser de Nd:YAG pulsado a 355 nm. Este instrumento es muy conocido por alta exactitud de la masa (<10 ppm con calibración externa) y alta resolución (>100.000 de anchura completa a la mitad de la altura). Esto significa que los oligosacáridos son fácilmente identificados basándose únicamente en su masa. La composición exacta con respecto a hexosas, N-acetilhexosaminas, ácido siálicos y fucosas es ahora conocida y se determina a partir de las masas exactas. Se cristalizaron muestras usando ácido 2,5-dihidroxibenzoico como matriz (5 mg/100 µl en una disolución de 50 % de acetonitrilo/50 % de agua (v/v)). La disolución de oligosacárido (1 µl) se aplicó a la sonda de MALDI, seguido de la adición de NaCl 0,01 M (0,5 µl) y la disolución de matriz (1 µl). Se secaron manchas de muestra por una técnica similar al método de evaporación rápida antes del análisis espectrométrico de masas. Los espectros se adquirieron en el modo de ión positivo y se calibraron internamente (Figura 1).

25 La mayoría de los espectros de masas en tándem de glucanos se producen por disociación inducida por colisión (CID), una técnica en tándem en la que iones precursores seleccionados son disociados por colisión con átomos de gas en una celda de colisión. Las colisiones aumentan la energía vibracional de los iones hasta tal punto que se produce la rotura del enlace revelando la composición del monosacárido.

30 Se realizó EM en tándem para obtener información sobre la composición monomérica. Usando disociación inducida por colisión (CID) de radiación sostenida no resonante (SORI) para determinar la composición y supuesta estructura de cada oligosacárido (Tabla 1). Se aisló el ión precursor y se excitó a 1000 Hz de su frecuencia de ciclotrón a una amplitud SORI de 2,55 V. Se usó gas nitrógeno como gas de colisión y se pulsó para mantener una presión de 10-6 Torr.

#### 35 Análisis comparativo de BMO y HMO

Se identificaron la composición y supuestas estructuras de BMO por MALDI FT-ICR, se compararon con la lista completa de estructuras de HMO y las composiciones aisladas de leche de mama humana reunida [16].

45 Se usó MALDI FT-ICR en leche bovina después de eliminar las enzimas de glucosidasa, y un ejemplo del espectro de masas resultante se presenta a continuación, además de la composición monomérica y la abundancia relativa. Por medio de la eliminación de enzimas de glucosidasa, los presentes inventores fueron capaces de descubrir la presencia de 24 iones de alto peso molecular de DP 7 a DP 10 nunca observados antes en leche bovina (Figura 1). Todos los 24 picos nuevos resultaron ser oligosacáridos de la leche, y 6 contuvieron fucosa en su extremo, un monómero previamente no informado en oligosacáridos de alto peso molecular de leche bovina (Tabla 1). La presente invención describe el uso de novedosas formulaciones de BMO y sus derivados, para modular la composición de microbiomas de mamífero y afectar positivamente la salud.

#### 50 BMO, una nueva clase de sustratos prebióticos

55 La prueba de anaerobios estrictos indicó que los BMO promueven el vigoroso crecimiento de *B. infantis* (Figura 2) y poco o ningún crecimiento del patógeno *Clostridium perfringens* (Figura 3). Y, lo que es más importante, los presentes inventores también encontraron que las cepas aisladas clínicas de los anaerobios facultativos *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* y *Vibrio cholerae*, *E. coli* O157:H7 carecieron de la capacidad de utilizar BMO (Figura 4). Tampoco se espera que otras bacterias enteropatógenas significativas, especie de *Shigella*, y otros serotipos de *Salmonella* y *V. cholerae*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Enterococcus faecalis*, *Eubacteria rectales* crezcan en BMO. Así, los BMO promovieron el crecimiento de una bacteria beneficiosa primaria sin potenciamiento metabólico a tres agentes patógenos, dos de los cuales producen considerable morbilidad a los seres humanos en países en desarrollo en el mundo. Estos datos posicionan los BMO como un mimético más adecuado de HMO que la actual colección de prebióticos comercial que se usa añadidos a la leche de inicio. Dada la significativa porción de BMO fucosilados que se descubrieron en leche bovina y productos lácteos y subproductos lácteos (tales como corrientes de suero de leche de queso, concentrado de proteína de suero de leche, permeado de suero de leche, extracto de proteína de suero de leche), es probable que estas fracciones sean eficaces en la unión y desvío de patógenos entéricos.

**Ejemplo 2:****Uso de composición de BMO para seleccionar cepas probióticas óptimas**

5 No existen probióticos comercialmente disponibles específicamente desarrollados para consumir BMO como sustrato prebiótico. Los BMO pueden usarse para identificar y cribar supuestas cepas probióticas usando un enfoque novedoso basado en oligosacáridos de la leche como un medio de enriquecimiento, aislamiento y eficacia. Este enfoque puede crear un panel de cepas probióticas que podría administrarse conjuntamente con BMO como aplicación simbiótica individual, y potenciar la persistencia intestinal y eficacia probiótica. Así, en algunas realizaciones, se seleccionan bacterias que pueden crecer sobre uno o más oligosacáridos de leche bovina como única fuente de carbono.

15 Enriquecimientos fecales usando BMO como único sustrato de crecimiento son una forma eficaz de seleccionar microorganismos BMO+. Para realizar los enriquecimientos fecales [20] puede usarse un medio químicamente definido recién desarrollado ZMB1 [21] que contiene BMO como única fuente de carbono. Se inocula una alícuota de 0,5 ml de ZMB1+BMO (2 %) con heces de bebés lactantes sanos (0,001 % de inóculo) y se deja que crezca durante 24 h y el cultivo se transfiere a una nueva alícuota de 0,5 ml. Este proceso se repite un total de 4 veces. Para obtener cepas aisladas bifidobacterianas emergentes, los enriquecimientos finales se siembran en placa en medio selectivo bifidobacteriano [22]. Se examinan microscópicamente células de supuestas colonias bifidobacterianas para confirmar la forma de células bifidas y se criban para la presencia de la fructosa-6-fosfato fosfocetolasa, una enzima únicamente presente en bifidobacterias [23]. Se siembran en réplica supuestas colonias bifidobacterianas y se cuentan las unidades formadoras de células después de la incubación en una cámara anaerobia a 37 °C durante 1-7 días.

25 Se transfieren colonias bifidobacterianas a placas de rejilla y se criban por PCR específica de género [24]. Las colonias positivamente identificadas como bifidobacterias se transfieren a placas de microtitulación que contienen 150 µl de BMO-ZMB1, 50 µl de aceite mineral esterilizado, y se cultivan durante 24-96 h en cámara anaerobia a 37 °C y se guardan a -80 °C. Se recogen cepas bacterias que presentan diferente morfología de la placa con el objetivo de obtener la mayor diversidad de especies bifidobacterianas y cepas aisladas BMO+. Una vez las colonias se almacenan, vuelven a extenderse en medio MRS y se caracterizan además por secuenciación de ADNr 16S para la clasificación de especies, y al nivel de subespecie por tipificación multilocus de secuencias (MLST).

35 Se tipifican las cepas aisladas de los enriquecimientos fecales por análisis de secuencias de secuencias de ribosómicas de 16S (ADNr), y MLST [25] un método de tipificación molecular que se ha usado para tipificar bifidobacterias estrechamente relacionadas al nivel de subespecie. Se usa PCR para amplificar regiones intragénicas de siete genes de mantenimiento (por ejemplo, *clpC*, *dnaB*, *dnaG*, *dnaJ1*, *purF*, *rpoC*, *xfp*) con cebadores de un estudio genómico comparativo de bifidobacterias [26]. Se alinean los datos de secuenciación resultantes para los loci usando el algoritmo CLUSTAL W, y se concatenan antes del análisis filogenético con MEGA 4.0 [27]. Se asignan secuencias alélicas como se ha descrito previamente [27]. Este análisis genera una clasificación taxonómica al nivel de cepa y al nivel de subespecie para bifidobacterias BMO+ aisladas de los estudios de enriquecimiento fecal.

**Uso de BMO para seleccionar cepas óptimas basándose en la cinética de crecimiento**

45 Después de la etapa de enriquecimiento fecal, se determina la cinética de crecimiento de bifidobacterias BMO+, y aquellas cepas que consumen óptimamente BMO pueden ser seleccionadas por este método de cribado. Esto puede llevarse a cabo usando métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, usando un método de alto rendimiento para medir la cinética de crecimiento de bifidobacterias HMO+, que emplea ensayos de crecimiento en placas de microtitulación en un entorno anaerobio [28]. Este método se usó para probar el crecimiento de *B. infantis* ATCC 15697 en BMO y se observó crecimiento vigoroso, sin embargo hubo un periodo de latencia significativo antes del crecimiento activo. Así, este ensayo puede ser útil para identificar cepas mejoradas que (a) consumen BMO a una velocidad más rápida y crecen a una densidad óptica más alta y (b) se adaptan más rápidamente al crecimiento de BMO (es decir, menos tiempo de latencia). Entonces se analizan los datos generados por los estudios de crecimiento para calcular la cinética de crecimiento para cada cepa y seleccionar cepas candidatas óptimas.

55 Por ejemplo, se recogen sobrenadantes al principio y final de los estudios de crecimiento de alto rendimiento, se esterilizan por filtración (filtro de 0,45 µm) y se inactivan térmicamente (100 °C durante 5 min). Se aíslan BMO por extracción en fase sólida usando carbono grafitizado, la concentración relativa de BMO individuales se obtiene por EM MALDI-FTICR como se ha descrito previamente [28]. La comparación entre los dos momentos de tiempo indica consumo bacteriano del sustrato prebiótico. Se calculan y analizan los espectros de masas para generar los glucoperfiles de consumo. Se tienen en cuenta los siguientes factores para guiar en la selección de cepas con capacidad de consumo de BMO óptima: cinética de crecimiento, glucoperfil de consumo de BMO, producción de bacteriocinas y posición taxonómica (es decir, dentro del clado asociado a bebés). Se considera que bifidobacterias BMO+ que pertenecen a uno de los clados de bebés reconocidos (*B. longum* sbsp. *infantis*, *B. breve*, *B. bifidum*), y que presentan desenlaces superiores en estos fenotipos son los candidatos preferidos en algunas realizaciones para una formulación simbiótica que contiene BMO y cepas probióticas relacionadas.

### Formulaciones simbióticas que contienen cepas BMO y BMO+ probióticas

Se espera que la combinación de BMO y bifidobacterias transmitidas por bebés seleccionadas puedan sensibilizar el establecimiento de una microbiota protectora típica de bebés lactantes sanos. Puede administrarse un producto simbiótico que comprende bifidobacterias BMO+ y una dosis relevante de BMO para prevenir diarrea infecciosa en bebés de alto riesgo con función de GIT comprometida. Ejemplos de poblaciones de bebés de alto riesgo son bebés prematuros e inmunodeprimidos, o bebés con un intestino corto tras cirugía para enterocolitis necrotizante, niños con trastornos del espectro autista. Estas poblaciones pediátricas frecuentemente padecen desequilibrios de la microbiota GIT recurrentes que conducen a episodios diarreicos frecuentes y otras formas de molestia GI [18]. El tratamiento probiótico - frecuentemente empleando cultivos de lactobacilos o bifidobacterias suministrados en alimentos lácteos - se ha asociado a desenlaces para la salud beneficiosos en una variedad de estados de enfermedad que incluyen reducción en diarrea [29], prevención de enterocolitis necrotizante [30], tratamiento de síndrome del intestino irritable [31], tratamiento de IBD y reacciones alérgicas [32]. Dada su larga historia de uso seguro y estado de GRAS, se espera que las cepas probióticas seleccionadas para la capacidad de consumir óptimamente BMO colonicen y persistan en el hospedador, mejorando así su eficacia y confiriendo beneficios al hospedador. Formulaciones de BMO y bifidobacterias son útiles, por tanto, tratando muchos problemas de salud gastrointestinales y basados en inmunológicos en poblaciones humanas, pediátricas y otras mamíferas.

### Uso de BMO para seleccionar bifidobacterias con capacidad de producción antimicrobiana

Se ha demostrado que la producción de bacteriocina es un medio por el que las bacterias probióticas colonizan el intestino y reducen la presencia de cepas patógenas [33]. Las secreciones de bifidobacterias dependen de la fuente de carbono usada para complementar los medios de crecimiento. Las composiciones de BMO pueden ser útiles para imitar HMO e inducir la secreción de bacteriocinas. A ese respecto, se cultivan cepas probióticas de colecciones de cultivo o enriquecimientos fecales en BMO y los sobrenadantes se criban para actividad de bacteriocina. Por ejemplo, puede usarse un simple ensayo de difusión de agar [34]. La actividad inhibidora de estos sobrenadantes se criba contra *Enterococcus faecalis*, *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Enterococcus faecalis*, *Eubacteria rectales* y *Salmonella enterica*, y otros patógenos entéricos comunes.

### Uso de BMO para la mejora de biomarcadores para la salud intestinal

El crecimiento de *Bifidobacteria* spp. en HMO produce elevada unión a las células intestinales. Se espera que los BMO, dadas sus similitudes estructurales con HMO, puedan aumentar la unión de bifidobacterias a células Caco-2. Para probar este efecto se realizan experimentos de adhesión estándar en cepas de bifidobacterias cultivadas en BMO, o lactosa como control, y se usa PCR en tiempo real para enumerar la unión de células microbianas/Caco-2 [35]. Además, se usan inserciones de cultivo Transwell para evaluar la capacidad de los microbios para afectar la permeabilidad epitelial o translocar a través de monocapas epiteliales colónicas [36].

Está bien establecido que las células epiteliales intestinales tienen receptores intracelulares y de la superficie celular que reconocen e inician la señalización celular en respuesta a la presencia de bacterias comensales y/o productos bacterianos [37]. Se ha mostrado que varias especies probióticas promueven la función de unión hermética de la barrera después de la rotura inducida por cualquier *E. coli* enteropatógena, daño químicamente inducido (es decir, colitis inducida por TNBS, un modelo de roedor común de enfermedad inflamatoria del intestino) y también daño inducido por citocinas. Para evaluar los efectos de los probióticos cultivados en BMO sobre la resistencia de monocapas, se miden las células para resistencia eléctrica transepitelial. Por ejemplo, se montan células en cámaras de microelectrodos de oro de ocho pocillos para la medición de la resistencia eléctrica transepitelial (TER) usando un sistema de detección de impedancia eléctrica célula-sustrato (ECIS) en tiempo real (Applied BioPhysics, Troy, NY). Para determinar si los probióticos cultivados en BMO son eficaces en prevenir la rotura de monocapa por IFN- $\gamma$  o TNF- $\alpha$ , se preincuban monocapas durante 2 h con la bacteria, seguido de la adición de o bien IFN- $\gamma$  (10 ng/ml) o TNF- $\alpha$  (10 ng/ml) a la cámara serosal. Además, para acceder a la función de MAPK, se añade el inhibidor de ERK PD-98059 (25  $\mu$ M) a la superficie apical 15 min antes de la incubación con probióticos cultivados en BMO. La resistencia se medirá con un voltímetro tras 24 h de incubación. Las mediciones se expresarán como ohmios por centímetro cuadrado.

Se usa RT-PCR en tiempo real para evaluar los niveles de citocinas de ARNm para IL-4, IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-10 e INF- $\gamma$  en células Caco-2 incubadas con probióticos incubados en BMO en los periodos de recogida específicos. Se aísla ARN total de raspaduras de células Caco-2 y se usa para generar ADNc usando cebadores al azar. Se evaluará el nivel de citocinas relativo en reacciones individuales usando cebadores específicos de gen y sondas marcadas dobles como se ha descrito previamente [36,38]. Se medirán indicadores de inflamación IL-6 e IL-1 $\beta$  usando cebadores según Newborg et al. [4].

### Uso de BMO para potenciar la colonización intestinal y persistencia de probióticos

Se formulan varios niveles de BMO diferentes en la dieta de pienso de ratón estándar con lactosa y pienso que no contiene azúcar de la leche añadida como piensos de control. Se puntúa la colonización/persistencia de *B. infantis*

en el intestino de ratón por examen de ADN fecal usando PCR cuantitativa específica de cepa, seguido de cuatro semanas. Se examina el impacto de *B. infantis*/MO sobre la microbiota intestinal de ratón completa por Q-PCR específica de *B. infantis* ATCC15697 y pirosecuenciación de la región V1-V3 amplificada de los genes de 16S ADNr obtenidos de ADN fecal.

5

#### Uso de BMO para desviar la infección por *Salmonella typhimurium*

Modelos de ratón de salmonelosis aguda (BALB/c, ratones *Nramp1*<sup>-/-</sup>) y crónica (129X1/SvJ, ratones *Nramp1*<sup>+/+</sup>) proporcionan una vía ideal para probar la capacidad de BMO para promover la protección y/o eliminación de infección. Estos modelos de infección se usan para evaluar si ratones alimentados con BMO con o sin *B. infantis* son más resistentes a la infección oral por *S. typhimurium*. Se evalúa la colonización bacteriana de los tejidos gastrointestinales tras la infección oral por PCR en tiempo real. Para el modelo crónico de salmonelosis, se evalúa la administración de BMO con o sin *B. infantis* para evaluar si esta complementación promueve la eliminación de patógenos o reduce la inflamación intestinal. Se evalúan la cuantificación de carga de patógenos en tejidos por PCR en tiempo real, evaluaciones histológicas de los tejidos infectados proporcionan información sobre la patología y progresión de la infección, y se usa perfilado de quimiocinas/citocinas para medir la respuesta inmunológica del hospedador.

10

15

#### Uso de BMO para prevenir y tratar trastornos del espectro autista (TEA)

20

Se ha propuesto recientemente que una disbiosis en la microbiota intestinal podría influir en la capacidad del hospedador para procesar xenobióticos intestinales y urinales con una posible función en el desarrollo temprano del cerebro y trastornos del autismo [39]. Los niños con TEA son deficientes en su capacidad de desintoxicación, y la sulfoconjugación de aminos fenólicas derivadas de la dieta, que pueden atravesar la barrera hematoencefálica, afecta negativamente la función de neurotransmisores y el sistema nervioso central [40]. Se sabe que la microbiota hospedadora metaboliza las aminos fenólicas derivadas de proteína, tales como fenilalanina y tirosina, para formar los metabolitos urinarios fenilacetilglutamina, sulfato de 4-cresol. Otros metabolitos urinarios como taurina, hipurato, ácido *N*-metilnicotínico, *N*-metilnicotinamida están alterados en niños con TEA [39], y pueden usarse como biomarcadores para medir la eficacia de la terapia basada en BMO para prevenir y tratar TEA.

25

30

En comparación con sus hermanos no autistas, el microbioma fecal de niños con TEA contiene elevada diversidad de *Clostridia* spp. reductoras de sulfato y cifras más altas de células del grupo de *Clostridium histolyticum* [41, 42]. Altos niveles de *Clostridia* spp. podrían, por tanto, tensar más la sulfoconjugación ya comprometida y capacidad de desintoxicación de niños con TEA, y el exceso de toxinas podría afectar negativamente el sistema nervioso central.

35

En algunas realizaciones, se usan las composiciones que comprenden los BMO descritos en el presente documento para desplazar y disminuir los niveles de poblaciones colónicas de *Clostridia* spp. en niños con TEA por BMO y complementación de *Bifidobacteria* spp. Puede lograrse la presencia de *Clostridia* spp. que disminuye la población de *Clostridia* spp. en niños con TEA administrando una cepa de BMO + *Bifidobacterium* spp. con alta capacidad de persistencia colónica con el tiempo.

40

#### Referencias

45

[1] Ninonuevo, M.R., et al., 1., A Strategy for Annotating the Human Milk Glycome. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006. 54(20): p. 7471-7480.

50

[2] Chaturvedi, P., et al., Survival of human milk oligosaccharides in the intestine of infants, in *Bioactive Components of Human Milk*. 2001. p. 315-323

55

[3] Roberfroid, M., Prebiotics: The concept revisited. *Journal of Nutrition*, 2007. 137(3): p.830s -837s

[4] Newburg, D.S., G.M. Ruiz Ruiz-Palacios, and A.L. Morrow, Human milk glycans protect infants against enteric pathogens. *Annual Review of Nutrition*, 2005. 25: p. 37-58.

60

[5] Harmsen, H.J.M., et al., Analysis of intestinal flora development in breast breast-fed and formula formula-fed infants by using molecular identification and detection methods. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 2000. 30(1): p. 61-67.

[6] Favier, C.F., et al., Molecular monitoring of succession of bacterial communities in human neonates. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002. 68(1): p. 219-226.

65

[7] LoCascio, R.G., et al., Glycoprofiling of Bifidobacterial Consumption of Human Milk Oligosaccharides Demonstrates Strain Specific, Preferential Consumption of Small Chain Glycans Secreted in Early Human Lactation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007. 55(22): p. 8914-8919

- [8] Favier, C.F., W.M. de Vos, and A.D.L. Akkermans, Development of bacterial and bifidobacterial communities in feces of newborn babies. *Anaerob Anaerobe*, 2003. 9(5): p. 219-229.
- 5 [9] Parracho MRT, O Bingham Max, Gibson G.R. and McCartney A. L. 2005. Differences between the gut microflora of children with autistic spectrum disorders and that of healthy children, *J Med Microbiol* 54, pp 987-991
- [10] Girard, M.P., et al., A review of vaccine research and development: human enteric infections. *Vaccine*, 2006. 24(15): p. 2732-50.
- 10 [11] Ball, T.M. and A.L. Wright, Health care costs of formula formula-feeding in the first year of life. *Pediatrics*, 1999. 103(4): p. 870-876.
- [12] Quigley, M.A., Y.J. Kelly, and A. Sacker, Breastfeeding and hospitalization for diarrheal and respiratory infection in the United Kingdom Millennium Cohort Study. *Pediatrics*, 2007. 119(4): p. 837 -42.
- 15 [13] Howie, P.W., et al., Protective effect of breast feeding against infection. *BMJ*, 1990. 300(6716): p. 11 11-6.
- [14] Wold, A.E. and I. Adlerberth, Breast feeding and the intestinal microflora of the infant implications for protection against infectious diseases. *Adv Exp Med Biol*, 2000. 478: p. 77-93.
- 20 [15] Journal Watch in Pediatric and Adolescent Medicine; Mar 26 2008
- [16] Ninonuevo M.R., Perkins P.D, Francis J., Lamotte L.M., LoCascio R.G. G., Freeman S., Mills D.A., German J.B., Grimm R., Lebrilla C.B. "Daily Variations in Oligosaccharides of Human Milk determined by microfluidic chip and mass spectrometry" *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 2008; 56(2); 618-626.
- 25 [17] Ruiz Ruiz-Palacios, G.M., et al., *Campylobacter jejuni* binds intestinal H(O) antigen (Fuc alpha 1, 2Gal beta 1, 4GlcNAc), and fucosyloligosaccharides of human milk inhibit its binding and infection. *Journal of Biological Chemistry*, 2003. 278(16): p. 14112-14120
- 30 [18] Narayanan, I., K. Prakash, and V.V. Gujral, The value of human milk in the prevention of infection in the high-risk low-birth -weight infant. *J Pediatr*, 1981. 99(3): p. 496 -8.
- 35 [19] Boehm, G. and Stahl, B. (2007) Oligosaccharides from milk. *J. Nutr.* 137, 847S-849S
- [20] Collado, M.C. and Y. Sanz, Method for direct selection of potentially probiotic *Bifidobacterium* strains from human feces based on their acid-adaptation ability. *J Microbiol Methods*, 2006. 66(3): p. 560-3.
- 40 [21] Zhang, G., D.A. Mills, and D.E. Block, Development of chemically defined media supporting high-cell cell-density growth of lactococci, entero enterococci, and streptococci., *Appl Environ Microbiol*, 2009. 75(4): p. 1080-7.
- [22] Munoa, F.J. and R. Pares, Selective medium for isolation and enumeration of *Bifidobacterium* spp. *Appl Environ Microbiol*, 1988. 54(7): p. 1715 1715-8.
- 45 [23] [Orban, J.I. and J.A. Patterson Patterson, Modification of the phosphoketolase assay for rapid identification of bifidobacteria. *J Microbiol Methods*, 2000. 40(3): p. 221 221-4.]
- 50 [24] Roy, D. and S. Sirois, Molecular differentiation of *Bifidobacterium* species with amplified ribosomal DNA restriction analysis and alignment of short regions of the *ldh* gene. *ysis Fems Microbiology Letters*, 2000. 191(1): p. 17 17-24.
- [25] Cai, H., et al., Genotypic and phenotypic characterization of *Lactobacillus casei* strains isolated from different ecological niches suggests frequent recombination and niche specificity. *Microbiology*, 2007. 153(Pt 8): p. 2655-65
- 55 [26] LoCascio et al. Comparative genomic hybridization of *Bifidobacterium longum* strains indicates conservation of milk oligosaccharide utilization in subsp. *infantis*. Submitted to *Applied and Environmental Microbiology*, 2010
- 60 [27] Ventura, M., et al., Analysis of bifidobacterial evolution using a multilocus approach. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2006. 56(Pt 12): p. 2783 2783-92.
- 65 [28] LoCascio, R.G., et al., A versatile and scalable strategy for glycoprofiling bifidobacterial consumption of human milk oligosaccharides. *Microbial Biotechnology*, 2009. 3(10): p.333.

- [29] McFarland, L.V., Meta-analysis of probiotics for the prevention of antibiotic associated diarrhea and the treatment of *Clostridium difficile* disease. *Am J Gastro Gastroenterol*, 2006. *enterol*, 101(4): p. 812-22.
- 5 [30] Deshpande, G., S. Rao, and S. Patole, Probiotics for prevention of necrotising enterocolitis in preterm neonates with very low birthweight: a systematic review of randomised controlled trials. *Lancet*, 2007. 369(9573): p. 1614 1614-20.
- [31] Haller, D., et al., Guidance for substantiating the evidence for beneficial effects of probiotics in chronic inflammatory bowel disease and the functional disorder irritable bowel syndrome. *Journal of Nutrition*, 2010. 140(3): p. 690S-7S]
- 10 [32] Furrie, E., Probiotics and allergy. *Proc Nutr Soc*, 2005. 64(4): p. 465 465-9]
- [33] Corr, S.C., et al., Bacteriocin production as a mechanism for the antiinfective activity of *Lactobacillus salivarius* UCC118. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007. 104(18): p. 7617-21.
- 15 [34] Tagg, J.R. and A.R. McGiven, Assay system for bacteriocins. *Appl Microbiol*, 1971. 21(5): p. 943.
- [35] Tao, N., et al., Bovine milk glycome. *Journal of Dairy Science*, 2008. 91(10): p. 3768-78.
- 20 [36] Kunz, C., et al., Oligosaccharides in milk of different species including man, rhesus monk monkey, cow and pig. *ey, Faseb Journal*, 1996. 10(3): p. 4328 4328-4328., 32.
- [37] Ninonuevo, M.R R., et al., Methods for the quantitation of human milk oligosaccharides in bacterial fermentation by mass spectrometry. *Analytical Biochemistry*, 2007. 361(1): p. 15-23.
- 25 [38] Xie, Y.M., et al., Method for the comparative glycomic analyses of O O-linked, mucin mucin-type oligosaccharides. *Analytical Chemistry*, 2004. 76(17): p. 5186-5197.
- [39] Yap I.K., Angley M., Veselkov K.A., Holmes H., Lindon J.C. and Nicholson J.K. Urinary Metabolic Phenotyping Differentiates Children with Autism from Their Unaffected Siblings and Age-Matched Controls. *J Prot Res*, 2010, 9 (6), pp 2996-3004
- 30 [40] Alberti A., Pirrone P., Elia M., Waring R.H. and Romano C. 1999. Sulphation deficit in "low-functioning" autistic children: a pilot study. *Biological Psychiatry*. 46: 420-424.
- 35 [41] Finegold S.M. et al, Gastrointestinal microflora studies in late-onset autism. *Clinical Infectious Diseases*. 35: S6-S16, 2002.
- 40 [42] Parracho, H. M. et al, Differences between the gut microflora of children with autistic spectrum disorders and that of healthy children. *J. Med. Microbiol*. 54 (10), pp. 987-991, 2005.

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición que comprende un oligosacárido purificado de leche o producto de leche bovina, de cabra, oveja, búfalo, u otro mamífero no humano domesticado, en la que el oligosacárido está seleccionado del grupo que consiste en:
- 10 un oligosacárido que consiste en 3 restos de Hex, 4 restos de HexNAc y 1 resto de fucosa (Fuc);  
 un oligosacárido que consiste en 4 restos de Hex, 4 restos de HexNAc y 1 resto de Fuc;  
 un oligosacárido que consiste en 5 restos de Hex, 4 restos de HexNAc y 1 resto de Fuc;  
 un oligosacárido que consiste en 4 restos de Hex, 5 restos de HexNAc y 1 resto de Fuc; y  
 un oligosacárido que consiste en 3 restos de Hex, 6 restos de HexNAc y 1 resto de Fuc.
- 15 2. La composición de la reivindicación 1, que comprende al menos dos oligosacáridos seleccionados del grupo que consiste en:
- 20 un oligosacárido que consiste en 3 restos de Hex, 4 restos de HexNAc y 1 resto de fucosa (Fuc);  
 un oligosacárido que consiste en 4 restos de Hex, 4 restos de HexNAc y 1 resto de Fuc;  
 un oligosacárido que consiste en 3 restos de Hex, 5 restos de HexNAc y 1 resto de Fuc;  
 un oligosacárido que consiste en 5 restos de Hex, 4 restos de HexNAc y 1 resto de Fuc;  
 un oligosacárido que consiste en 4 restos de Hex, 5 restos de HexNAc y 1 resto de Fuc;  
 un oligosacárido que consiste en 3 restos de Hex, 6 restos de HexNAc y 1 resto de Fuc;  
 un oligosacárido que consiste en 3 restos de hexosa (Hex) y 6 restos de N-acetil hexosamina (HexNAc),  
 un oligosacárido que consiste en 4 restos de Hex y 3 restos de HexNAc;  
 un oligosacárido que consiste en 3 restos de Hex y 4 restos de HexNAc;  
 un oligosacárido que consiste en 6 restos de Hex y 2 restos de HexNAc;  
 un oligosacárido que consiste en 4 restos de Hex y 4 restos de HexNAc;  
 un oligosacárido que consiste en 3 restos de Hex y 5 restos de HexNAc;  
 un oligosacárido que consiste en 5 restos de Hex y 4 restos de HexNAc;  
 un oligosacárido que consiste en 4 restos de Hex y 5 restos de HexNAc; y  
 un oligosacárido que consiste en 3 restos de Hex y 6 restos de HexNAc.
- 25 3. La composición de la reivindicación 1, en la que el oligosacárido se ha purificado de leche bovina o un producto de leche bovina.
- 30 4. La composición de la reivindicación 1, que comprende además un inóculo de una bacteria, hongo o levadura.
- 35 5. La composición de la reivindicación 4, en la que la bacteria es una especie de *Bifidobacteria*.
- 40 6. La composición de la reivindicación 5, en la que la bacteria está seleccionada de *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*, *B. breve* y *B. bifidum*.
- 45 7. Un método de obtención del oligosacárido de la reivindicación 1, comprendiendo el método:  
 purificar oligosacáridos de leche bovina o un producto de leche bovina, en el que la purificación comprende inactivar enzimas degradadoras de fucosa, ácido siálico, N-acetilglucosamina, lacto-N-biosa, glucosa y galactosa en leche y/o separar las enzimas de oligosacáridos en la leche, obteniéndose así oligosacáridos.
- 50 8. Un método de obtención del oligosacárido de la reivindicación 1, que comprende purificar el oligosacárido de leche bovina.
- 55 9. El método de la reivindicación 8, en el que la purificación comprende separar enzimas degradadoras de fucosa, ácido siálico, N-acetilglucosamina, lacto-N-biosa, glucosa y galactosa en leche del oligosacárido.
10. Un método de modificación del oligosacárido purificado de la reivindicación 1, que comprende poner en contacto el oligosacárido purificado con al menos una enzima modificadora, añadiendo o eliminando así uno o más restos químicos del oligosacárido purificado, generándose así un oligosacárido modificado.
- 60 11. El método de la reivindicación 10, en el que la enzima modificadora está seleccionada del grupo que consiste en una fucosidasa, fucosiltransferasa, sialidasa, sialiltransferasa, una glucosidasa y una glucosiltransferasa.
- 65 12. La composición de la reivindicación 1 para su uso en un método de tratamiento de una afección en un individuo, en la que la afección está seleccionada de  
 diarrea;  
 enterocolitis necrotizante;  
 síndrome del intestino irritable;  
 reacción alérgica;  
 trastorno del espectro autista (TEA); y

presencia de especies *Enterococcus faecalis*, *Clostridium difficile* y *Salmonella enterica*, *Salmonella typhimurium*, *Vibrio cholerae*, *E. coli* O157:H7, *Clostridium perfringens*, *Vibrio cholerae*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Enterococcus faecalis*, *Eubacteria rectales* o *Shigella* en el individuo.

- 5 13. La composición para su uso según la reivindicación 12, en la que el oligosacárido estimula selectivamente la producción de una secreción bifidobacteriana que modula la salud intestinal en el individuo;  
mejora al menos un biomarcador de la salud intestinal en el individuo; o  
aumenta la colonización intestinal y persistencia de bacterias probióticas en el individuo.

10

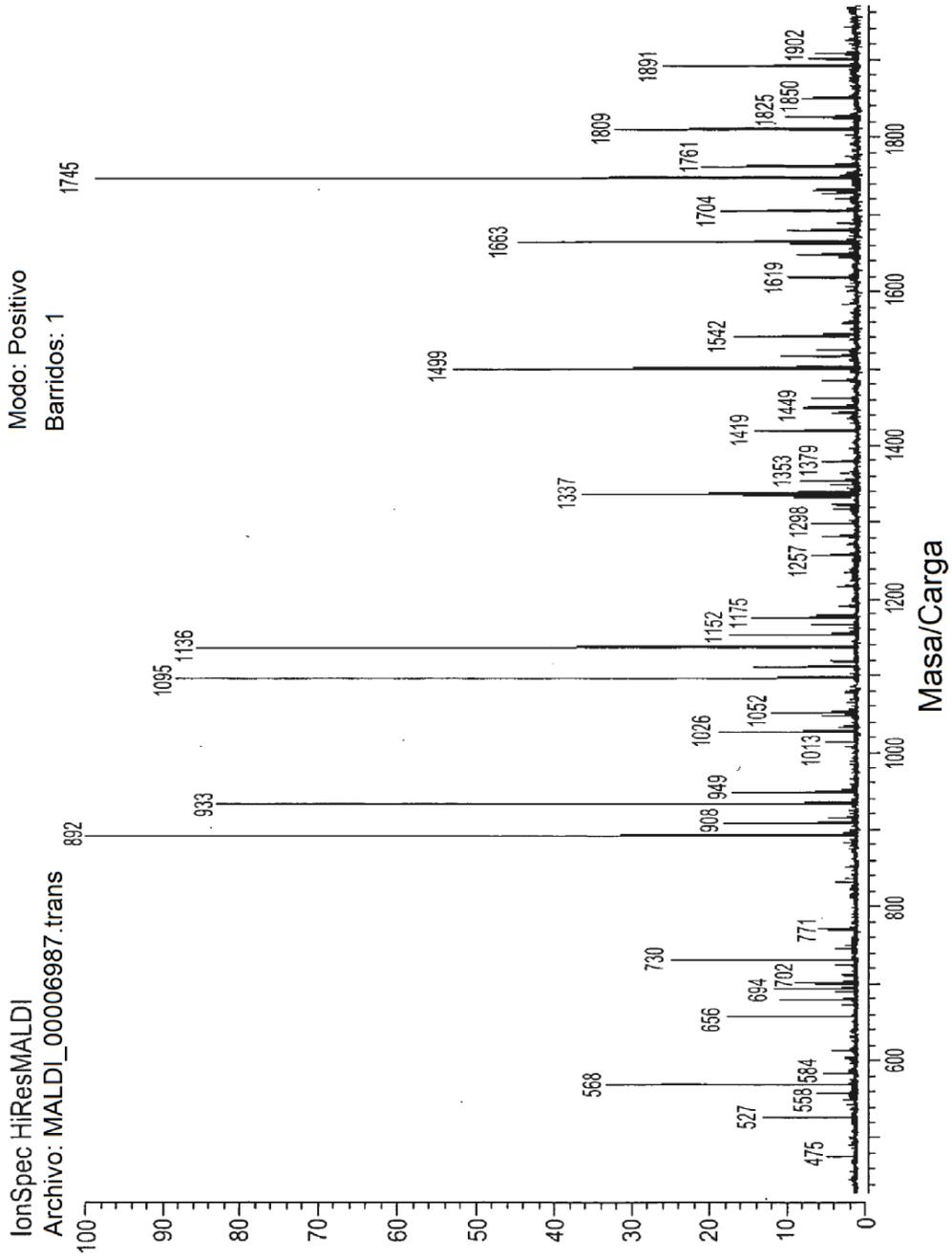
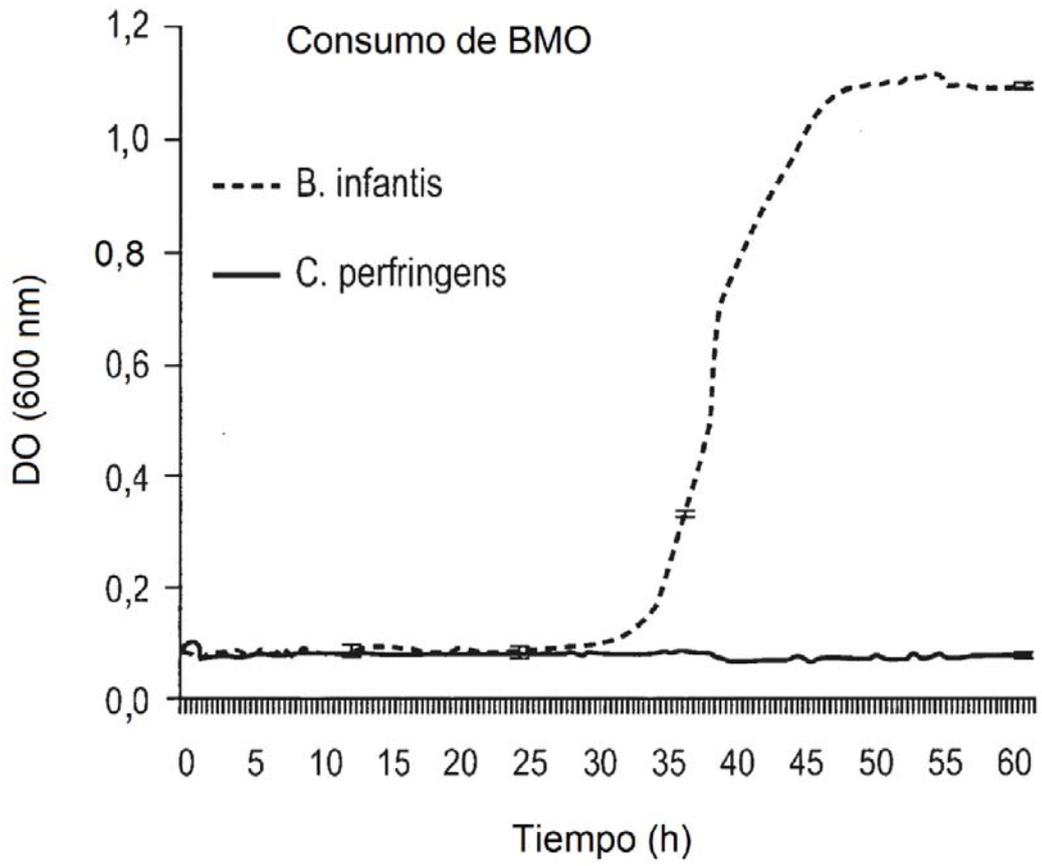
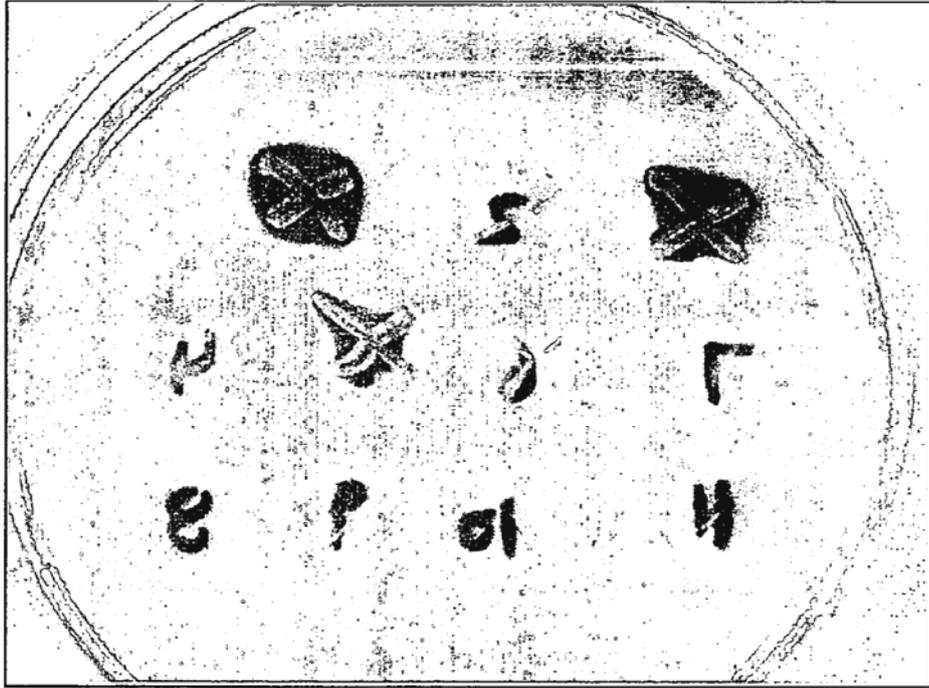


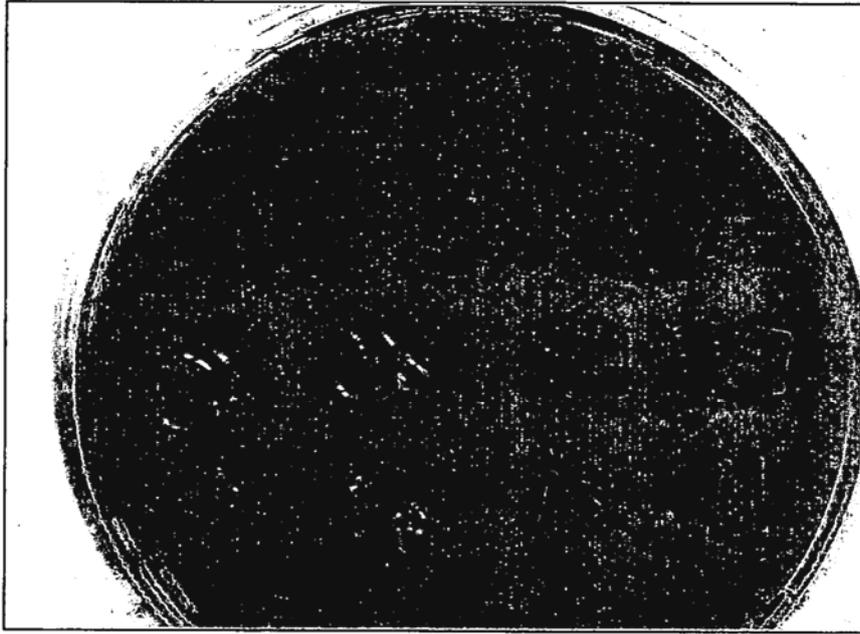
FIG. 1



**FIG. 2**



**FIG. 3A**



**FIG. 3B**